УДК.619578.832.577.2

Акопян Ж.И., Саркисян Х.В., Маркосян Т.А., Газарянц М.Г.
(Научный центр оценки и анализа рисков безопасности пищевых продуктов» ГНКО Республики Армения, «Институт молекулярной биологии» НАН РА, Министерство Сельского Хозяйства, Республика Армения, МСХ РА)

ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА СА-МОДИФИЦИРОВАННОЙ РНК ПРИ РЯДЕ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Ключевые слова:ящур, болезнь Ньюкасла, иммуностимулятор

Введение

При инфекционных заболеваниях вирусного происхождения очень важно создание и применение ранних превентивных средств, поскольку вакцины, применяемые при профилактике ряда вирусных заболеваний лишь через некоторое время проявляют свои иммунные свойства, а за это время вирус успевает размножиться и поразить новые клетки (1). В связи с этим довольно ощутимые иммуностимулирующие свойства проявляют препараты, получаемые на основе олигонуклеотидов, которые испытываются и как адъюванты, и как противовирусные препараты как в медицине, так и в ветеринарии (2). Ранее нами было показано, что Са-модифицированный препарат РНК обладает значительно высоким иммуностимулирующим и адъювантным свойствами к таким вирусным инфекциям как ящур свиней, болезнь Ньюкасла птиц и др.(3,4). Известны методы активной профилактики болезни Ньюкасла с помощью инактивированных вакцин или их сочетания в зависимости от эпизоотической ситуации (5). Однако, как лизогенные вакцинные штаммы, так и лентогенные, наряду с положительными свойствами, обладают и рядом недостатков. Вакцины из мезогенных штаммов наиболее иммуногенны, но обладают остаточной вирулентностью. Мезогенный вирус может вызывать респираторные, а иногда и нервные явления. В связи с выраженной реактогенностью их нельзя вводить цыплятам до 30-60 дневного возраста. Примеряемая вакцина штамма «Н» влияет на яйценоскость, а при гиповитаминозе, пуллорозе, кокцидозе, ларинготрахеите, бронхите птиц ее применение сопровождается большим отходом птицы (6). Лентогенные вакцинные штаммы («В», «Ла-Сота» и др.), как естественно ослабленные, так и аттенуированные лабораторными методами, менее патогенны, чем мезогенные и получили наиболее широкое применение в современном птицеводстве. Однако, при аэрозольном методе вакцинации, штамм «В» обладает недостаточной иммуногенностью, хотя не вызывает поствакциональных осложнений и обеспечивает невосприимчмвость к заражению у 70-75% обработанных птиц (7).

Целью представленной работы является определение оптимальных доз препарата у морских свинок, зараженных вирусом ящура, а также в попытке создания эффективного способа профилактики болезни Ньюкасла кур любого возраста, дающего высокий процент невосприимчивости к заражению.

Материалы и методы

Для получения Са-модифицированного препарата РНК сырьем служил нуклеинат натрия, который получали в ОАО «Биосинтез» (г.Пенза, РФ), либо выделенном из киллерных дрожжей Saccharomyces cerevisiae, который представляет собой легко растворимый в воде без запаха желто-серый порошок. В нем содержится 13,6% азота (N), 7,8% фосфата (P), 0,1 г белка на сухой вес, соотношение N/P составляет 1,74. Модификацию ионами Са проводили добавлением стерильного раствора кальция хлорида порядка 200-250 мг и 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты до появления легкой устойчивой опалесценции в течение 40 минут. В растворе препарат активен 30 дней при температуре 4-10^{0}С. Для определения оптимальной дозы препарата морские свинки весом 350-400 г распределяли на 4 группы по 10 животных в каждой. Препарат вводили внутримышечно в различных дозах и через 48 часов животных подвергали заражению вирусом ящура «О» в дозе 10^4 ИД$_{50}$. Птицам внутримышечно вводили 10 мг/кг веса Са-модифицированного препарата нуклеината натрия. Исследование крови птиц по

определению титров антител проводили с помощью реакции задержки гемагглютинации (РЗГА) (8).

Результаты и обсуждения

В первой серии опытов была определена оптимальная доза защиты вводимого препарата.

Как видно из результатов, представленных в таблице 1, все морские свинки контрольной группы , которые не получили препарат, заболели генерализованной формой ящура. В первой группе животных, которым вводили 2,5 мг/кг массы, защита составляла 40%, а в 2-4 группах % защиты животных после введения 5-25 мг/кг препарата составлял 80-90%, что является удовлетворительным показателем. Дальнейшие исследования проводились для определения оптимального времени введения препарата. С этой целью препарат в дозе 15 мг/кг вводили внутримышечно морским свинкам весом 350-400 г в группах, состоящих из 8 животных. Результаты полученных данных представлены в таблице 2.

Таблица 1. Влияние различных доз препарата на зараженных ящуром морских свинок

N/N	Доза препарата мг/кг	Количество животных	Количество защищенных животных	Количество заболевших животных
1	2.5	10	4	6
2	5.0	10	8	2
3	15	10	9	1
4	25	10	8	2
5	Контроль (без препарата)	6	0	6

Таблица 2. Действия препарата в зависимости от времени его введения

N/N	Время введения препарата (час) (до заражения)	Количество животных	Количество защищенных животных	Количество заболевших животных
1	6	8	6	2
2	12	8	7	1
3	24	8	6	2
4	48	8	7	1
5	96	8	7	1
6	120	8	5	3
7	144	8	3	5
8	Контроль (без препарата)	6	0	6

Из табл. 2 видно, что уже начиная с шестого часа после введения препарата наблюдается его защитное действие на 75%, которое увеличивается к 96 часам с увеличением степени защиты действия вируса ящура до 80-85%, затем следует падение его действия к 120-144 часам. Подобная временная экстренная защита животных крайне важна, ибо если с предлагаемым препаратом вводить и специфическую вакцину, то выработка иммунитета наблюдается, начиная с седьмого дня после введения вакцины, что предохранит животных от поголовного заражения их вирусом ящура.

Механизм действия препарата, по-видимому, связан с его способностью стимулировать синтез эндогенного интерферона, обладающего известной противовирусной активностью, а также усилением формирования иммунного ответа Т- и В-клеток. Что касается химической модификации ионами кальция, то это крайне важный момент, ибо ионы кальция обеспечивают стабильность препарата, продлевают время его действия, защищают препарат от разрушающего действия тканевых неспецифических нуклеаз, способствуют большей пенетрации препарата через клеточную мембрану.

Таким образом, по результатам этой серии экспериментов можно сделать заключение, что предлагаемый препарат в дозе 15 мг/кг защищает морских свинок от за-

ражения вирусом ящура типа «О» в дозе 10^4 $ИД_{50}$.

Относительно действия препарата при болезни Ньюкасла птиц было проведено три опыта, где вся подопытная птица была разделена на три группы по 100 голов в каждой и 50 голов в контрольной группе.

Первая группа получала препарат нуклеината натрия в кальциевой форме по 15 мг/кг веса внутримышечно одновременно с вакциной.

Вторoя группа цыплят получала препарат по 10 мг/кг веса на третий день после введения вакцины.

Третья группа цыплят получала только вакцину по обычной схеме.

Контрольная группа птиц не получала ни вакцины, ни препарата Са-нуклеината. По истечению 10 дней после вакцинации у первых трех экспериментальных групп брали кровь для определения титра антител, значение которых достигало 1:1024. У второй группы, где нуклеинат Са вводили на третий день после вакцины, максимальное значение титра антител составляло 1:256. В то же время, в третьей экспериментальной группе, получавшей только вакцину, титр антител колебался в пределах разведения сыворотки от 1:4 до 1:64. Эти данные позваляют предположить, что модифицированный препарат нуклеината натрия, введенный птицам одновременно с вакцинированием, значительно усиливает действие применяемой вакцины.

Согласно принятой инструкции, через 15 дней после вакцинации было проведено контрольное заражение подопытных цыплят всех четырех групп эпизоотическим штаммом «Г» вируса болезни Ньюкасла. Вирус вводили цыплятам внутримышечно по 0.2 мл и наблюдали за выживаемостью птиц. Результаты трех экспериментов суммированы в представленной таблице 3.

Таблица 3. Сравнительная характеристика применения сочетанного с вакциной препарата нуклеината натрия, обработанного ионами Са при болезни Ньюкасла кур

N/N	Количество голов	Время введения препарата Са-нуклеината	Титр антител	Кол-во павщих цыплят	% подежа цыплят
1	100	Одновременно с вакциной	1:1024	10	9
2	100	После вакцины	1:256	14	15
3	100	Только вакцина	1:64	20	20
4	50	Контроль	-	50	100

Из представленных в таблице данных видно, что в контрольной группе отмечается 100% гибель подопытных птиц.

В третьей группе, получавшей только вакцину, падеж составлял 20%, что соответствует примерному падежу вакцинированной птицы в птицеводческих хозяиствах. Несколько ниже был падеж птицы во второй группе. И, наконец, самый низкий падеж птиц наблюдался в первой группе экспериментаьной птицы.

Новый подход профилактитки болезни Ньюкасла кур путем вакцинирования, отличается от известных способов тем, что с целью повышения невосприимчивости к заболеванию, одновременно с закапыванием в ноздри 2 капель вакцины штамма "Ла-Сота" внутримышечно вводят Са-модифицированный препарат нуклеината натрия в дозе 15 мг/кг веса экспериментальной птицы.

Существующие моно-, ди- и мультивалентные вакцины, производимые в различных странах, защищают животных с выработкой иммунитета, как правило, с 7-10 дня после их введения в организм. Однако, в случае вспышки ящура, за этот период происходит практически поголовное заражение животных с последующей их гибелью, что наносит большой экономический ущерб и приводит к значительным финансовым потерям, наносит вред окружающей среде. Чрезвычайно важно то обстоятельство, что введение этого препарата приводит к экстренной защите животных уже спустя 6 часов после его введения с 80-85% защитой животных от заражения вирусом ящура [9]. Из полученных нами экспериментальных данных следует, что препарат имеет неспецифические иммуностимулирующие свойства и создает экстренную защиту животных независимо от типовой штаммовой принадлежности вирусов и не вызывает побочных осложнений.

Обобщая полученные нами экспериментальные данные, можно допустить, что эффект дс-РНК реализуется посредством

стимуляции первичного и вторичного иммунного ответа, синтеза интерферона и ряда биохимических реакций, зависящих, по крайней мере, от двух процессов: а) повышения уровня 2',5'-олигоаденилата, активирующего латентную дс-РНК-зависимую РНК-азу, б) индукции дс-РНК-зависимой протеинкиназы, фосфорилирующий фактор инициации elf-Z . Кроме того, показано, что дс-РНК существенно повышает уровень фосфорилирования белков плазматической мембраны, активирует трансмембранные токи экстрацеллюларного иона кальция, повышает активность фосфолипазы А2 , которая свою очередь приводит к накоплению и высвобождению лизоформ фосфолипидов и ненасышенных жирных кислот, обладающих иммуномодулирующими свойствами [9].

Резюме:В работе представлены эксперимантальные данные иммуностимулирующих свойств Са-модифицированной РНК при ящуре и Ньюкаслской болезни птиц. Была определена оптимальная доза защиты и оптимального времени введения Са-модифицированной РНК на морских свинках при заражении ящуром. В работе также показанно что при Ньюкаслской болезни птиц препарат, введенный птицам одновременно с вакцинированием, значительно усиливает действие применяемой вакцины. Представлены возможные механизмы действия препарата при стимуляции первичного и вторичного иммунного ответа что по-видимому, связан с способностью препарата стимулировать синтез эндогенного интерферона, обладающего известной противовирусной активностью, а также усилением формирования иммунного ответа Т- и В-клеток.

SUMMARY

The experimental data regarding immunopotentiating activities of the Ca – modifying RNA against FMD and Newcastle disease of poultry are presented. The optimal dose of protection and optimal time of injection of the Ca – modifying RNA on guinea pigs after infection of foot-and-mouth are determined. In the presented work also shown that using of preparation simultaneously with the vaccination agains Newcastle disease, significantly enhancing the effect of the vaccine. The possible mechanisms of the preparation for the potentiating of the primary and secondary immune response which are possible connected with the ability of the preparation to stimulate the synthesis of endogenous interferon with the furter antiviral activity, as well as the strengthening of the immune response of T-and B-cells are presented in the work.

Keywords: food-and-mouth disease, Newcastle disease, immunopotentator

Литература

1. Новая стратегия борьбы с особо опасными и наиболее распространенными болезнями сельскохозяйственных животных/ Рухкян Л.А., Нерсесян С.Е., Акопян Ж.И., Маркосян Т.А. // Мат. межд. Конф. Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животны. - Ульяновск, 2006. - С. 435 – 438

2. Терапевтические препараты на основе нуклеиновых кислот / Власов В.В. // Съезд Российской общества биохимиков и молекулярных билогов. Сб. трудов. - Новосибирск, 2008. - С.19

3. Новый подход к профилактике болезни Ньюкасла кур / Акопян Ж.И., Газарянц М.Г., Маркосян Т.А. // НАН Армении Доклады. - Ереван, 2010. - Т-110., N3. - С. 291 - 294

4. Нерсесян С.Е., Акопян Ж.И., Рухкян Л.А. // Противоящурная вакцина. Патент 1906А2. - Республика Армения. - 15.03.2007. - с.5

5. Гусева Е.В., Сатина Г.А. // В кн: Вирусные болезни кур. Современные аспекты ветеринарной патологии животных. - Владимир, 1998. – с.128

6. Современные стратегии вакцинопрофилактики инфекционных болезней птиц в Российском птицеводстве. Тенденции и перспективы / Ирза В.Н., Борисов А.В., Борисов В.В., Старов С.К. // Акт. проблемы инф. патологии животных. - Владимир, 2003, с. 277 - 284

7. Оценка эпизоотической ситуации и особенности специфической профилактики при ньюкаслской болезни / Родин Ю.В., Смоленский В.И., Руденко Т.В., Горева И.П., Родин В.В. // Вестникветеринарии, Ставрополь, 1998.- №2.- с.66-75.

8. Isolation of Avian Pathogens / Swayne D.E., Senne D.A., Beard C.W. - Pennsylvania, USA., 1998. - p.160.

9. Билогическая активность двуспиральной РНК / Акопян Ж.И., Казарян П.А. // Ж. Фарма, Ереван, 2011. - N 3. - с. 77 - 82

Контактная информации об авторах для переписки

Саркосян Х.В., Маркосян Т.А. - сотрудники «Научного центра оценки и анализа рисков безопасности пищевых продуктов» ГНКО Республики Армения; scsbv@yahoo.com

Акопян Ж., Газарянц М.Г. - сотрудники «Института молекулярной биологии» НАН РА; khabez@bk.ru